

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005年9月1日 (01.09.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/080562 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12N 15/00, C07K 14/47, 16/18, C12Q 1/68, G01N 33/53, 33/574

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/012446

(22) 国際出願日: 2004年8月24日 (24.08.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2004-047036 2004年2月23日 (23.02.2004) JP

(71) 出願人および

(72) 発明者: 山元 弘 (YAMAMOTO, Hiroshi) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1-6 大阪大学大学院薬学研究科内 Osaka (JP). 小西 登 (KONISHI, Noboru) [JP/JP]; 〒6348521 奈良県橿原市四条町840番地 奈良県立医科大学医学部内 Nara (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 辻川 和丈 (TSUJIKAWA, Kazutake) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1-6 大阪大学大学院薬学研究科内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 高島 一 (TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目1番1号 明治安田生命大阪御堂筋ビル Osaka (JP).

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

規則4.17に規定する申立て:

- すべての指定国のための不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て(規則4.17(v))

添付公開書類:

- 國際調査報告書
- 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF ADJUDICATING ON PROSTATE CANCER

(54) 発明の名称: 前立腺癌の判定方法

(57) Abstract: A method of adjudicating a test subject having the danger of having developed prostate cancer or having the danger of being about to develop prostate cancer, comprising the steps of: (a) analyzing the presence of any mutation in gene PCA-1 derived from the test subject or the degree of such mutation; and (b) adjudicating the test subject on the presence of the danger of having developed prostate cancer or the danger of being about to develop prostate cancer or on the degree thereof on the basis of the presence of any mutation in gene PCA-1 or the degree thereof. This method of adjudicating on prostate cancer enables simply and with high sensitivity adjudicating test subjects having the danger of having developed prostate cancer or having the danger of being about to develop prostate cancer. Therefore, the method is effective in prostate cancer diagnosis, follow-up observation, prognosis prediction, pre-onset diagnosis, carrier diagnosis, etc.

(57) 要約: 本発明は前立腺癌を発症している危険がある又は発症する危険がある被検者を判定するための方法であって、以下の工程: a) 当該被検者由来のPCA-1遺伝子の変異の有無又は程度を解析する工程; 及び b) PCA-1遺伝子の変異の有無又は程度により、当該被検者が前立腺癌を発症している危険又は発症する危険の有無又は程度を判断する工程; を含む、方法に関する。本発明の前立腺癌の判定方法を用いれば、簡易かつ高感度に前立腺癌を発症している危険がある又は発症する危険がある被検者を判定することができるので、前立腺癌の診断、経過観察、予後の予測、発症前診断、保因者診断等に有効である。

WO 2005/080562 A1

明細書

前立腺癌の判定方法

技術分野

本発明は、前立腺癌の判定方法に関する。更に詳しくは、本発明は、前立腺癌を
5 発症している危険がある又は発症する危険がある被検者を判定するための方法で
あって、以下の工程：

- a) 当該被検者由来の P C A – 1 遺伝子の変異の有無又は程度を解析する工程；及
び
- b) P C A – 1 遺伝子の変異の有無又は程度により、当該被検者が前立腺癌を発症
10 している危険又は発症する危険の有無又は程度を判断する工程；
を含む、方法に関する。

背景技術

前立腺癌は、欧米において男性癌罹患率、死亡率の上位を占める悪性腫瘍である。
日本でも近年、食生活の欧米化と高齢化に伴い前立腺癌の罹患率、死亡率が急速に
15 上昇している。

現在前立腺癌の診断は、癌グレード (tumor grade) やステージ等の組織病理学的判定や PSA 値などの生化学的パラメーターに依存している。中でも、集団検診や人間ドックにおいて、血中前立腺特異抗原 (Prostatic Specific Antigen : PSA) 濃度の測定が急速に普及し、比較的早期に前立腺癌が発見できるようになった。しかし、血中 PSA 濃度の上昇は前立腺癌の発症後において認められるものであり、また血中 PSA 濃度による診断は前立腺肥大症 (benign prostatic hyperplasia) や前立腺炎 (prostatitis) との区別が困難である場合があり、前立腺癌の検出、診断、経過観察のための、より特異的で高感度な新たなマーカーの開発が望まれている。

本願発明者らは、前立腺癌の治療標的分子を検索する目的で、前立腺癌患者から
25 摘出された前立腺組織を、病理組織学的に腫瘍部分と非腫瘍部分とに分離し、非腫瘍部分と腫瘍部分との間で発現量に差のある遺伝子を解析した。その結果、非腫瘍部分と比較して腫瘍部分に特異的に高発現している遺伝子として、P C A – 1 (ヒト AlkB ホモローグ 3 (human AlkB homolog 3: hABH3) とも呼ばれる) と呼ばれる遺

伝子のクローニングに成功した（第123回日本薬学会年会要旨集4、p15、2003年）。近年、PCA-1はDNA, RNAアルキル化損傷修復酵素であることが確認され、その機能が注目されている（ネイチャー（Nature）、第421巻、p859-863、2003年）。

5 上記事情に鑑み、本発明は、前立腺癌を発症している危険がある又は発症する危険がある被検者を判定する新たな方法を提供することを目的とする。

発明の開示

本発明者らは、上記目的を達成すべく銳意研究した結果、前立腺癌組織においてPCA-1遺伝子の発現が上昇し、PCA-1の機能の亢進が前立腺癌の発症あるいは進行と何らかの因果関係があると考えられたのとは対照的に、前立腺癌患者においては、PCA-1の機能異常を起こし得るようなPCA-1遺伝子の変異が高頻度で認められることを見出し、本発明を完成させるに至った。

即ち、本発明は以下の（1）～（19）に関する。

（1）前立腺癌を発症している危険がある又は発症する危険がある被検者を判定するための方法であって、以下の工程：

a) 当該被検者由来のPCA-1遺伝子の変異の有無又は程度を解析する工程；及び
b) PCA-1遺伝子の変異の有無又は程度により、当該被検者が前立腺癌を発症している危険又は発症する危険の有無又は程度を判断する工程；
20 を含む、方法。

（2）変異がミスセンス変異、ナンセンス変異、サイレント変異及び欠失によるフレームシフト変異からなる群から選ばれる、上記（1）に記載の方法。

（3）ミスセンス変異が、PCA-1ポリペプチドの第7番目のアルギニンのロイシンへの変異、第8番目のアラニンのバリンへの変異、第30番目のアラニンのスレオニンへの変異、第41番目のスレオニンのイソロイシンへの変異、第73番目のアスパラギン酸のアスパラギンへの変異、第137番目のグリシンのアルギニンへの変異、第144番目のセリンのプロリンへの変異、第228番目のアスパラギン酸のグルタミン酸への変異、第233番目のグルタミン酸のアルパラギン酸への

変異、及び第261番目のリジンのアスパラギンへの変異からなる群から選択されるアミノ酸の変異をもたらす変異である、上記（2）に記載の方法。

（4）ミスセンス変異が、PCA-1ポリペプチドの第228番目のアスパラギン酸のグルタミン酸への変異、第233番目のグルタミン酸のアルパラギン酸への変異、及び第261番目のリジンのアスパラギンへの変異からなる群から選択されるアミノ酸の変異をもたらす変異である、上記（3）に記載の方法。

（5）ミスセンス変異がPCA-1ポリペプチドの第228番目のアスパラギン酸のグルタミン酸への変異をもたらす変異である、上記（4）に記載の方法。

（6）ミスセンス変異が、PCA-1遺伝子の第426番目のグアニンのチミンへの変異、第429番目のシトシンのチミンへの変異、第494番目のグアニンのアデニンへの変異、第528番目のシトシンのチミンへの変異、第623番目のグアニンのアデニンへの変異、第815番目のグアニンのアデニンへの変異、第836番目のチミンのシトシンへの変異、第1090番目のシトシンのグアニンへの変異、第1105番目のアデニンのチミンへの変異、及び第1189番目のアデニンのチミンへの変異からなる群から選択される変異である、上記（3）に記載の方法。

（7）ミスセンス変異が、PCA-1遺伝子の第1090番目のシトシンのグアニンへの変異、第1105番目のアデニンのチミンへの変異、及び第1189番目のアデニンのチミンへの変異からなる群から選択される変異である、上記（6）に記載の方法。

（8）ミスセンス変異が、PCA-1遺伝子の第1090番目のシトシンのグアニンへの変異である、上記（7）に記載の方法。

（9）ナンセンス変異が、PCA-1ポリペプチドの第261番目のリジンのストップコドンへの変異をもたらす変異である、上記（2）に記載の方法。

（10）ナンセンス変異が、PCA-1遺伝子の第1187番目のアデニンのチミンへの変異である、上記（9）に記載の方法。

（11）サイレント変異が、PCA-1遺伝子の第568番目のチミンのシトシンへの変異、及び第1132番目のグアニンのチミンへの変異からなる群から選択される変異である、上記（2）に記載の方法。

(12) サイレント変異が、P C A - 1 遺伝子の第 1 1 3 2 番目のグアニンのチミンへの変異である、上記 (11) に記載の方法。

(13) 欠失が、P C A - 1 遺伝子の第 7 7 7 番目のアデニンから第 8 6 5 番目のシトシンまでの残基の欠失である、上記 (2) に記載の方法。

5 (14) 以下の工程を含む、上記 (1) に記載の方法：

- a) 当該被検者からポリヌクレオチドを単離又は精製する工程；
- b) 当該ポリヌクレオチドから P C A - 1 遺伝子を増幅する工程；
- c) 増幅された P C A - 1 遺伝子の塩基配列を決定する工程；
- d) 当該被検者由来の P C A - 1 遺伝子の変異の有無又は程度を解析する工程；
- 10 e) P C A - 1 遺伝子の変異の有無又は程度により、当該被検者が前立腺癌を発症している危険又は発症する危険の有無又は程度を判断する工程。

(15) 配列番号 1 と比較して、第 4 2 6 番目のグアニンのチミンへの置換、第 4 2 9 番目のシトシンのチミンへの置換、第 4 9 4 番目のグアニンのアデニンへの置換、第 5 2 8 番目のシトシンのチミンへの置換、第 6 2 3 番目のグアニンのアデニンへの置換、第 8 1 5 番目のグアニンのアデニンへの置換、第 8 3 6 番目のチミンのシトシンへの置換、第 1 0 9 0 番目のシトシンのグアニンへの置換、第 1 1 0 5 番目のアデニンのチミンへの置換、第 1 1 8 9 番目のアデニンのチミンへの置換、第 1 1 8 7 番目のアデニンのチミンへの置換、第 5 6 8 番目のチミンのシトシンへの置換、第 1 1 3 2 番目のグアニンのチミンへの置換、及び第 7 7 7 番目のアデニンから第 8 6 5 番目のシトシンまでの配列の欠失からなる群から選択される 1 以上の置換又は欠失を有する塩基配列を含むポリヌクレオチド。

(16) 配列番号 1 と比較して、第 4 2 6 番目のグアニンのチミンへの置換、第 4 2 9 番目のシトシンのチミンへの置換、第 4 9 4 番目のグアニンのアデニンへの置換、第 5 2 8 番目のシトシンのチミンへの置換、第 6 2 3 番目のグアニンのアデニンへの置換、第 8 1 5 番目のグアニンのアデニンへの置換、第 8 3 6 番目のチミンのシトシンへの置換、第 1 0 9 0 番目のシトシンのグアニンへの置換、第 1 1 0 5 番目のアデニンのチミンへの置換、第 1 1 8 9 番目のアデニンのチミンへの置換、第 1 1 8 7 番目のアデニンのチミンへの置換、及び第 7 7 7 番目のアデニンから第

865番目のシトシンまでの配列の欠失からなる群から選択される1以上の置換又は欠失を有する塩基配列にコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチド。

(17) 上記(16)のポリペプチドを免疫特異的に認識する抗体。

(18) 前立腺癌を発症している危険がある又は発症する危険がある被検者を判定するためのキットであって、PCA-1遺伝子変異解析用試薬を含む、キット。

(19) PCA-1遺伝子変異解析用試薬が、前立腺癌を発症している危険がある又は発症する危険がある被検者を判定するために使用できる、又は使用すべきであることを記載した記載物を更に含む、上記(17)に記載のキット。

本発明の前立腺癌の判定方法を用いれば、簡易かつ高感度に前立腺癌を発症している危険がある又は発症する危険がある被検者を判定することができるので、前立腺癌の診断、経過観察、予後の予測、発症前診断、保因者診断等に有効である。

図面の簡単な説明

図1はMM S濃度と接着細胞数の関係を示すグラフである。縦軸は接着細胞数をコントロール群を100%としたときの相対値として示す。横軸はMM S濃度(mM)を示す。また、黒色カラムはコントロール群を、斜線カラムはPCA-1WTトランスフェクション群を、白色カラムはPCA-1Δ777-865トランスフェクション群をそれぞれ示す。

発明の詳細な説明

本発明において、「前立腺癌」とは、前立腺において発生した癌を広く包含する概念であり、前立腺に発生した腺癌のみならず、扁平上皮癌、移行上皮癌、神経内分泌癌、未分化癌等をも包含する。好ましくは、前立腺癌は前立腺に発生した腺癌である。

ヒトにおいて、PCA-1はヒトAlkBホモローグ3(human AlkB homolog 3: hABH3)あるいはDEPC-1とも呼ばれる分子である。

正常ヒトPCA-1遺伝子の塩基配列(cDNA塩基配列)としては、例えば、配列番号1等が挙げられ、このうち第407番目-第1267番目の残基(配列番号3)がタンパク質コード領域に該当し、配列番号2のアミノ酸配列からなるPCA-1ポリペプチドをコードする。本発明において、PCA-1遺伝子の塩基配列及

びアミノ酸配列における残基の位置は、上記配列番号1、2の配列をそれぞれ基準とする。ここで、配列番号1において第923～1243番目の残基及び配列番号2における第172～279番目のアミノ酸残基がPCA-1の脱アルキル化酵素活性部位に相当する。

5 ヒトPCA-1遺伝子は第11番染色体のp11のローカスにコードされており、PCA-1遺伝子およびその周辺の染色体DNA塩基配列は、例えば、ジーンバンクアクセッショ番号NT_009237 (NCBIホームページ)等に開示されている。

ヒトPCA-1遺伝子は、10のエクソンを含み、配列番号1において、エクソン1は、第1番目～第334番目の残基、エクソン2は、第335番目～第485番目の残基、エクソン3は、第486番目～第592番目の残基、エクソン4は、第593番目～第624番目の残基、エクソン5は、第625番目～第670番目の残基、エクソン6は、第671番目～第776番目の残基、エクソン7は、第777番目～第865番目の残基、エクソン8は、第866番目～第1075番目の残基、エクソン9は、第1076番目～第1172番目の残基、エクソン10は、第1173番目～第1520番目の残基、にそれぞれ該当する。

本発明の前立腺癌の判定方法は、少なくとも以下の工程：

a) 被検者由来のPCA-1遺伝子の変異の有無又は程度を解析する工程；及び

b) PCA-1遺伝子の変異の有無又は程度により、当該被検者が前立腺癌を発症

20 している危険又は発症する危険の有無又は程度を判断する工程；

を含む。

被検者由来のPCA-1遺伝子の変異の有無又は程度を解析する工程においては、被検者由来のPCA-1遺伝子を、正常PCA-1遺伝子と比較する。

被検者由来のPCA-1遺伝子と正常PCA-1遺伝子との比較は、特に限定さ

25 れないが、例えば正常PCA-1遺伝子のmRNA、cDNA、染色体DNA等の塩基配列との比較である。

ここで、「正常PCA-1遺伝子の塩基配列との比較」は、正常PCA-1遺伝子の全長塩基配列との比較以外に、当該配列の相補的配列、部分配列、部分配列の相補的配列、特定残基の配列等との比較であってもよい。

ここで、上記部分配列の長さは、少なくとも10塩基以上、好ましくは30塩基以上である。部分配列の好ましい態様としては、PCA-1のタンパク質コード領域の塩基配列、PCA-1遺伝子のエクソン領域の塩基配列が挙げられる。

被検者由来のPCA-1遺伝子の変異の有無又は程度の解析は、自体公知のいずれの方法を用いることができる。

例えば、被検者由来のポリヌクレオチド中のPCA-1遺伝子の塩基配列を決定してもよい。また、当該分野で塩基の変化を検出するために現在使用されているあらゆる方法、例えば、RFLP法、TaqMan試験、オリゴヌクレオチドリガーゼ法、一重鎖コンホメーション多形性、鑄型核酸のオリゴヌクレオチドアレーへのハイブリダイゼーションに基づく試験法、変性グラジェントゲル電気泳動法、PCR-SSPC法、サザンプロット法、ノザンプロット法、ASO法、ミスマッチプライマーを用いるARMS法等も用いることができる。あるいは、将来開発される方法も、上記比較による変異の存否の解析方法に用いることができる。好ましくは、被検者由来のポリヌクレオチド中のPCA-1遺伝子の塩基配列を決定する。

被検者由来のポリヌクレオチド中のPCA-1遺伝子の塩基配列を決定するにあたっては、まず被検者よりポリヌクレオチドを単離又は精製する。当該ポリヌクレオチドは、好ましくは、当該被検者由来のPCA-1遺伝子を含む。

当該ポリヌクレオチドは、当該被検者由来の試料、例えば、組織、細胞、液体成分等から単離又は精製される。

組織としては、特に限定されないが、例えば、前立腺、毛髪、皮膚等が挙げられ、好ましくは前立腺である。

細胞には、被検者から分離され培養されていない細胞、生体から分離され培養された細胞いずれもが含まれる。例えば血液細胞、前立腺由来細胞等が挙げられ、好ましくは前立腺由来細胞である。

液体成分としては、例えば、血液、精液、唾液、尿、汗等が挙げられる。

ポリヌクレオチドとしては、例えば、DNA（染色体DNA、cDNA等）及びRNA（total RNA、mRNA、cRNA等）が挙げられ、好ましくは染色体DNA、total RNAまたはmRNAである。

ポリヌクレオチドは自体公知の方法により単離又は精製することができる。

5 染色体DNAの単離又は精製には、例えば、プロテイナーゼK／フェノール抽出法、プロテイナーゼK／フェノール／クロロホルム抽出法、アルカリ溶解法、ボイリング法等を用いることができる。

また、total RNAの単離又は精製には、例えばグアニジン－塩化セシウム超遠心法、AGPC法（Acid guanidinium-Phenol-Chloroform法）等を用いることができる。あるいは、TRIzol（Life Technologies, Inc. 製）、Isogen（ニッポンジーン社製）等の市販のキットを用いることもできる。

mRNAの単離又は精製は、精製されたtotal RNAをオリゴdTカラム等に供することによって達成することができる。

15 ポリヌクレオチドがRNA、特にtotal RNA、mRNAである場合は、逆転写酵素等を利用した自体公知の方法により、cDNAを合成することが好ましい。

当該ポリヌクレオチド中のPCA-1遺伝子の塩基配列の決定にあたっては、好ましくは、当該ポリヌクレオチドを錆型として、ポリヌクレオチド中のPCA-1遺伝子を増幅する。錆型とされるポリヌクレオチドは、特に限定されないが、好ましくは染色体DNA又はcDNAである。

遺伝子増幅の方法は、特に制限されないが、ポリメラーゼ連鎖反応法（polymerase chain reaction; PCR法）、LAMP（Loop-mediated isothermal amplification）（例えば、WO 00/28082 参照）、ICAN（Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic acids）（例えば、WO 00/56877 参照）、自己持続的配列複製（Guatelliら（1990）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1874～1878）、転写増幅系（Kwohら（1989）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1173～1177）、Q- β レプリカーゼ（Lizardiら（1988）Bio/Technology 6: 1197）等が例示され、いずれも用いることが可能であるが、PCR法が簡便であり好ましい。PCR技術の

一般的使用についての参考文献は、Mullis et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51:263, (1987), Ehrlich(ed), PCR technology, Stockton Press, NY, 1989, Ehrlich et al., Science, 252:1643-1650(1991), PCR protocols;A Guide to Methods and Applications, Eds. Innis et al., Academic Press, New York, (1990)等に詳しい。

PCR法によるPCA-1遺伝子の増幅において用いられるポリメラーゼとしては、当業者が通常用いるTaqポリメラーゼ等をいずれも用いることが可能であるが、好ましくは比較的フィデリティの高いポリメラーゼ、例えばKOD Plus (TOYOBO社製) 等が用いられる。

PCR法によるPCA-1遺伝子の増幅においては、当該遺伝子の増幅を可能とするようなオリゴヌクレオチドプライマー対を用いる。当該プライマー対は、例えば配列番号1の塩基配列等の本明細書中の情報や、ジーンバンクアクセッショ番号NT_009237 (NCBIホームページ) 等に開示されたヒト第11番染色体のp11の領域の塩基配列等に基づき、Oligo 4.0.6 (National Bioscience社製、Plymouth MN) 等の適切なプログラム等を用いて、当業者が適切に設計することが可能である。

PCRにおける錆型が、cDNAである場合には、当該プライマー対が設定される領域は特に限定されないが、当該プライマー対は、好ましくは、配列番号1において、第426番目のグアニン、第429番目のシトシン、第494番目のグアニン、第528番目のシトシン、第568番目のチミン、第623番目のグアニン、第815番目のグアニン、第836番目のチミン、第1090番目のシトシン、第1105番目のアデニン、第1132番目のグアニン、第1187番目のアデニン、第1189番目のアデニン、及び第777番目のアデニンから第865番目のシトシンまでの残基からなる群から選択される少なくとも1つ、より好ましくは2つ以上、最も好ましくは全ての残基を増幅しうるよう、設定される。

また、PCRにおける錆型が染色体DNAである場合には、当該プライマー対が設定される領域は特に限定されないが、当該プライマー対は、好ましくは、エクソン領域を増幅し得るように設定され、より好ましくは、上述の残基に対応する染色

体DNA上の残基を少なくとも1つ、更に好ましくは2つ以上、最も好ましくは全て増幅しうるように設定される。複数のプライマー対を設定してもよい。

プライマーとして用いるオリゴヌクレオチドの大きさは、適宜選択することが可能であるが、通常10～100bp、好ましくは12～50bp、より好ましくは

5 15～30bpである。

プライマーとして用いるオリゴヌクレオチドのGC含量は、適宜設定することが可能であるが、通常20～80%、好ましくは30～70%、より好ましくは40～60%の範囲である。

プライマーとして用いるオリゴヌクレオチドのTm値は、通常60±20°Cの範囲に設定される。Tm値はバッファー中の塩濃度等に依存して異なるが、自体公知の方法、例えばnearest neighbor法（例えば「Biochemistry, 35, 3555-3562, 1996」など参照）等により算出することが出来る。

オリゴヌクレオチドは、天然に存在するもの又は合成されたもののいずれでもよいが、ホスホトリエチル法、ホスホジエステル法等により、通常用いられる核酸自動合成装置を利用して合成することが可能である。

当該プライマーは、増幅産物の大きさが通常50～30000bp程度となるよう設定される。増幅効率等を考慮すると、増幅産物の大きさが、好ましくは、50～3000bp程度、より好ましくは100～2000bp程度となるよう設定される。

20 好ましいプライマー対としては、例えば、

プライマー1：CTGAAAGCTCGGAGCAGAACGC（配列番号4）

プライマー2：GGTCTACTGTGGAACAG（配列番号5）

からなるプライマー対等が挙げられる。

増幅されたPCA-1遺伝子は、周知の方法により塩基配列が決定される。好ましい方法としては、Sanger等の方法を用いた鑄型ポリメラーゼ生成複写物への末端ヌクレオチドの取込みに基づくものが挙げられる。また、代替法としては、例えば、アダプター配列決定（PCT/US95/12678）、連結に基づく配列決定（PCT/US

96/05245)、ハイブリダイゼーションによる配列決定 (A. D. Mirzabekov, TIBTech12: 27 - 32, 1994) 等が挙げられる。

決定された塩基配列に基づいて、当該被検者由来のPCA-1遺伝子の変異の有無又は程度が解析される。

5 上記增幅において用いた錫型が染色体DNAである場合には、好ましくは、決定された塩基配列中のPCA-1遺伝子のエクソン領域に含まれる塩基配列を、正常PCA-1遺伝子のcDNA塩基配列中の対応塩基配列と比較する。また、上記增幅において用いた錫型がcDNAである場合には、決定された塩基配列と正常PCA-1遺伝子のcDNA塩基配列中の対応塩基配列とを比較する。

10 被検者由来のPCA-1遺伝子に変異が検出された場合、即ち解析した被検者由来のPCA-1遺伝子において、正常PCA-1遺伝子とは異なる残基が1塩基またはそれ以上検出された場合は、当該被検者は、前立腺癌を発症している危険がある（又は高い）又は発症する危険がある（又は高い）と判断する。逆に、被検者由来のPCA-1遺伝子に変異が検出されない場合、当該被検者は前立腺癌を発症している危険がない（又は低い）又は発症する危険がない（又は低い）と判断する。

15 また、本発明の方法においては、変異の程度が大きいほど、当該被検者が前立腺癌を発症している危険又は発症する危険が高くなると判断することができる。「変異の程度」とは、例えば変異部位の数、変異に係る塩基の長さ等をいう。

20 また、PCA-1遺伝子の変異は、被検者由来のPCA-1遺伝子の対立遺伝子のどちらか一方に存在すれば、当該被検者が前立腺癌を発症している危険がある又は発症する危険があると判断するが、対立遺伝子の双方に変異がある場合は、一方のみに変異がある場合と比較してより危険がある（又は高い）と判断することができる。

25 また対立遺伝子間に優劣がある場合には、優勢遺伝子に変異がある場合は、劣勢遺伝子に変異がある場合と比較してより危険がある（又は高い）と判断することができる。

また、本発明の方法は、他の前立腺癌の診断方法等と組合せて用いることにより、判定の精度を向上させることができる。他の前立腺癌の診断方法としては、触診検

査、血清中等の前立腺特異抗原（PSA）濃度を用いる方法、前立腺針生検サンプルを用いた病理検査、超音波検査、MR I、CT、骨シンチ等が挙げられる。また、PCA-1遺伝子が前立腺癌組織において発現が向上していることを指標とした検査方法（非特許文献1参照）とも、本発明の方法を組合せて用いることができる。

5 上記PCA-1遺伝子の変異の部位は、特に限定されない。

染色体DNAにおいては、PCA-1遺伝子をコードする領域（例えばエンハンサー領域、プロモーター領域、エクソン領域、イントロン領域等）のいずれであってもよいが、好ましくはエクソン領域又はイントロン領域であり、より好ましくはエクソン領域である。

10 cDNA、mRNAにおいては、当該PCA-1遺伝子の変異の部位は、好ましくはタンパク質コード領域である。

上記PCA-1遺伝子の変異の種類は、特に限定されず、例えばミスセンス変異、ナンセンス変異又はサイレント変異等の置換による変異、欠失、挿入等により生じるフレームシフト変異などが挙げられるが、好ましくは変異はミスセンス変異、ナンセンス変異、サイレント変異及び欠失により生じるフレームシフトからなる群から選択される。

PCA-1遺伝子のミスセンス変異におけるアミノ酸変異の態様は、特に限定されない。好ましくは、ミスセンス変異は、PCA-1ポリペプチドの第7番目のアルギニン、第8番目のアラニン、第30番目のアラニン、第41番目のスレオニン、第73番目のアスパラギン酸、第137番目のグリシン、第144番目のセリン、第228番目のアスパラギン酸、第233番目のグルタミン酸、及び第261番目のリジンからなる群から選択されるアミノ酸残基の変異をもたらす変異である。

この場合、当該置換後のアミノ酸の種類は、特に限定されない。好ましくは、ミスセンス変異は、PCA-1ポリペプチドの第7番目のアルギニンのロイシンへの変異、第8番目のアラニンのバリンへの変異、第30番目のアラニンのスレオニンへの変異、第41番目のスレオニンのイソロイシンへの変異、第73番目のアスパラギン酸のアスパラギンへの変異、第137番目のグリシンのアルギニンへの変異、第144番目のセリンのプロリンへの変異、第228番目のアスパラギン酸のグル

タミン酸への変異、第233番目のグルタミン酸のアルパラギン酸への変異、及び第261番目のリジンのアスパラギンへの変異からなる群から選択されるアミノ酸の変異をもたらす変異である。

より好ましくは、当該ミスセンス変異は、PCA-1ポリペプチドの脱アルキル化酵素活性部位（PCA-1ポリペプチドの第172～279番目のアミノ酸残基に相当）におけるアミノ酸の変異、即ち、第228番目のアスパラギン酸のグルタミン酸への変異、第233番目のグルタミン酸のアルパラギン酸への変異、及び第261番目のリジンのアスパラギンへの変異からなる群から選択されるアミノ酸の変異をもたらす変異である。

更に好ましくは、当該ミスセンス変異は、PCA-1ポリペプチドの第228番目のアスパラギン酸のグルタミン酸への変異をもたらす変異である。

上記ミスセンス変異においては、変異後のアミノ酸をコードする塩基配列は特に限定されない。好ましくは、当該ミスセンス変異は、PCA-1遺伝子の、第426番目のグアニンのチミンへの変異、第429番目のシトシンのチミンへの変異、第494番目のグアニンのアデニンへの変異、第528番目のシトシンのチミンへの変異、第623番目のグアニンのアデニンへの変異、第815番目のグアニンのアデニンへの変異、第836番目のチミンのシトシンへの変異、第1090番目のシトシンのグアニンへの変異、第1105番目のアデニンのチミンへの変異、及び第1189番目のアデニンのチミンへの変異からなる群から選択される変異である。

PCA-1遺伝子のナンセンス変異におけるアミノ酸変異の様態は、特に限定されないが、当該ナンセンス変異は、PCA-1ポリペプチドの第261番目のリジンのストップコドンへの変異をもたらす変異が好ましい。

当該ナンセンス変異においては、変異後のストップコドンをコードする塩基配列は特に限定されない。好ましくは、当該ナンセンス変異は、PCA-1遺伝子塩基配列の第1187番目のアデニンのチミンへの変異である。

PCA-1遺伝子のサイレント変異における変異部位は、特に限定されないが、当該サイレント変異は、好ましくは、PCA-1遺伝子の第568番目のチミン、

第 1 1 3 2 番目のグアニンからなる群から選択される残基における変異であり、より好ましくは、第 1 1 3 2 番目のグアニンにおける変異である。

当該サイレント変異においては、変異後の塩基は特に限定されない。好ましくは、当該サイレント変異は、PCA-1 遺伝子の、第 5 6 8 番目のチミンのシトシンへ 5 の変異、及び第 1 1 3 2 番目のグアニンのチミンへの変異からなる群から選択される変異である。

PCA-1 遺伝子の欠失において、欠失される塩基の数、位置等は特に限定されない。好ましくは、欠失は一つ又は複数個のエクソン領域の欠失であり、より好ましくは、欠失は一つのエクソン領域の欠失である。

10 欠失されるエクソン領域は、特に限定されないが、ヒト PCA-1 遺伝子の場合、好ましくは、エクソン 7 (配列番号 1 における第 7 7 7 番目—第 8 6 5 番目の残基) である。

当該欠失は、PCA-1 ポリペプチドの、第 1 2 4 番目からのアミノ酸の置換をもたらすと共に、第 1 3 6 番目のアミノ酸のストップコドンへの置換をもたらすので、第 1 3 5 番目のアミノ酸までタンパク質翻訳が終止される。 15

また、本発明は、配列番号 1 と比較して、第 4 2 6 番目のグアニンのチミンへの置換、第 4 2 9 番目のシトシンのチミンへの置換、第 4 9 4 番目のグアニンのアデニンへの置換、第 5 2 8 番目のシトシンのチミンへの置換、第 6 2 3 番目のグアニンのアデニンへの置換、第 8 1 5 番目のグアニンのアデニンへの置換、第 8 3 6 番 20 目のチミンのシトシンへの置換、第 1 0 9 0 番目のシトシンのグアニンへの置換、第 1 1 0 5 番目のアデニンのチミンへの置換、第 1 1 8 9 番目のアデニンのチミンへの置換、第 1 1 8 7 番目のアデニンのチミンへの置換、第 5 6 8 番目のチミンのシトシンへの置換、第 1 1 3 2 番目のグアニンのチミンへの置換、及び第 7 7 7 番 25 目のアデニンから第 8 6 5 番目のシトシンまでの配列の欠失からなる群から選択される 1 以上の置換又は欠失を有する塩基配列を含むポリヌクレオチドに関する。 好ましくは、当該ポリヌクレオチドは、配列番号 1 と比較して、上記群から選択される 1 以上の置換を有する塩基配列からなるポリヌクレオチドである。

また、上記ポリヌクレオチドの一部であって、配列番号1と比較して、上記群から選択される1以上の置換又は欠失を有するポリヌクレオチドも本発明に包含される。当該ポリヌクレオチドの一部の長さは少なくとも10bp以上、好ましくは30bp以上である。

5 上記本発明のポリヌクレオチドは、ヒトPCA-1遺伝子の変異の解析において、例えばミスマッチプライマーやミスマッチプローブ等の試薬として、あるいは変異を有するPCA-1遺伝子を含むことが既に明らかとなっているポリヌクレオチドコントロールとして有用である。

10 また、本発明のポリヌクレオチドを機能的に挿入した適当な発現ベクターを、前立腺癌細胞等の宿主細胞に導入し、変異を有するPCA-1ポリペプチドを発現させた後に、当該宿主細胞を解析すること等で、PCA-1遺伝子の変異と前立腺癌との関連について研究することができる。従って、本発明のポリヌクレオチドは、前立腺癌研究用試薬として有用である。

本発明のポリヌクレオチドは好ましくは単離され又は精製されている。

15 また、本発明は、配列番号1と比較して、第426番目のグアニンのチミンへの置換、第429番目のシトシンのチミンへの置換、第494番目のグアニンのアデニンへの置換、第528番目のシトシンのチミンへの置換、第623番目のグアニンのアデニンへの置換、第815番目のグアニンのアデニンへの置換、第836番目のチミンのシトシンへの置換、第1090番目のシトシンのグアニンへの置換、
20 第1105番目のアデニンのチミンへの置換、第1189番目のアデニンのチミンへの置換、第1187番目のアデニンのチミンへの置換、及び第777番目のアデニンから第865番目のシトシンまでの配列の欠失からなる群から選択される1以上の置換又は欠失を有する塩基配列にコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチドに関する。好ましくは、当該ポリペプチドは、配列番号1と比較して、上記群から選択される1以上の置換又は欠失を有する塩基配列にコードされるアミノ酸配列からなるポリペプチドである。

また、上記ポリペプチドの部分であって、上記群の置換又は欠失により置換されたアミノ酸を少なくとも1つ含むポリペプチドも本発明に包含される。当該部分ポ

リペプチドの長さは少なくとも6アミノ酸以上、好ましくは8アミノ酸以上である。

本発明のポリペプチドは好ましくは単離され又は精製されている。

本発明のポリペプチドは、上記の変異を有するヒトPCA-1のポリペプチドを免疫特異的に認識する抗体の製造のための免疫原として有用である。本発明は当該

5 抗体にも関する。

「免疫特異的」とは、当業者が通常抗体を使用する条件において、その抗体が他のポリペプチドに対するその親和性よりも特定のポリペプチドに対して、実質的に高い親和性を示すことを意味する。本発明において「他のポリペプチド」としては、例えば正常ヒトPCA-1ポリペプチド等が挙げられる。

10 抗体には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体 (mAb) 等の天然型抗体、遺伝子組換技術を用いて製造され得るキメラ抗体、ヒト化抗体や一本鎖抗体、ヒト抗体産生トランスジェニック動物等を用いて製造され得るヒト抗体、Fab 発現ライ

15 ブラリーによって作製された抗体断片、およびこれらの結合性断片が含まれるが、これらに限定されない。好ましくは、抗体はポリクローナル抗体、モノクローナル抗体およびこれらの結合性断片である。

結合性断片とは、前述の抗体の一部分の領域を意味し、具体的には例えば F(ab')₂、Fab'、Fab、Fv (variable fragment of antibody)、sFv、dsFv (disulphide stabilised Fv)、dAb (single domain antibody) 等が挙げられる (Exp. Opin. Ther. Patents, Vol. 6, No. 5, p. 441-456, 1996)。

20 抗体のクラスは、特に限定されず、IgG、IgM、IgA、IgDあるいはIgE等のいずれのアイソタイプを有する抗体をも包含する。好ましくは、IgG または IgM であり、精製の容易性等を考慮すると IgG がより好ましい。

本発明の抗体は、慣用のプロトコールを用いて、マウス、ウサギ等の哺乳動物 (好ましくはヒト以外の哺乳動物) に当該ポリペプチド等を投与すること等により得られる。

モノクローナル抗体の調製には、ケーラー及びミルシュタインらの方法 (Nature, Vol. 256, p. 495-497, 1975) 及びそれに準じる修飾方法に従って行うことができる。本発明のポリペプチドに特異的に反応する抗体を產生するハイブリドーマの

スクリーニングにおいては、本発明のポリペプチドに含まれる変異部位が、正常PCA-1のアミノ酸に置換された対応コントロールペプチドを用い、本発明のポリペプチドには反応するが、対応コントロールペプチドには反応しないクローンを選択することができる。

5 ポリクローナル抗体の調製は、好ましくは、本発明のポリペプチドを免疫した動物の血清を本発明のポリペプチドを結合させたカラム等によって精製される。更に好ましくは、より特異性を高めるために、上記対応コントロールペプチドを結合させたカラムを用いて正常ヒトPCA-1に反応しうる画分が除去される。

10 本発明の抗体は、好ましくは、飽和硫酸アンモニウム、ユーグロブリン沈澱法、カプロイン酸法、カブリル酸法、イオン交換クロマトグラフィー (DEAE または DE 52 等) 、抗イムノグロブリンカラムあるいはプロテインAカラム、免疫原を架橋させたカラム等を用いたアフィニティカラムクロマトグラフィーにより単離又は精製される。

15 本発明の抗体は変異を有するヒトPCA-1ポリペプチドを免疫特異的に認識するので、例えばウェスタンプロット法、免疫組織染色、ELISA法、RIA法、表面プラズモン共鳴法、プロテインチップ等により、被検者由来のPCA-1遺伝子が変異を有するか否かを解析することが可能である。

本発明の前立腺癌を発症している危険がある又は発症する危険がある被検者を判定するための方法は、上記抗体を用いた方法をも包含する。

20 また、本発明は、前立腺癌を発症している危険がある又は発症する危険がある被検者を判定するためのキットであって、PCA-1遺伝子変異解析用試薬を含むキットに関する。

当該キットには、好ましくは、当該PCA-1遺伝子変異解析用試薬は、前立腺癌を発症している危険がある又は発症する危険がある被検者を判定するために使用できる、又は使用すべきであることを記載した記載物が更に含まれる。

PCA-1遺伝子変異解析用試薬は、本発明の方法に使用されるあらゆる試薬のいずれであってもよい。例えば、PCA-1遺伝子の増幅に用いられるオリゴヌクレオチドプライマー対、正常PCA-1遺伝子を含むことが既に明らかとなつてい

る単離され又は精製されたポリヌクレオチド、変異を有するPCA-1遺伝子を含むことが既に明らかとなっている単離され又は精製されたポリヌクレオチド、変異を有するヒトPCA-1ポリペプチドに免疫特異的に結合する抗体等が挙げられる。

5 以下、実施例を示して本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下に示す実施例によって何ら限定されるものではない。

(実施例1)

化学療法又はホルモン療法をこれまでに受けたことのない前立腺癌患者4人の術後標本より、病理組織学的に癌部およびその周辺非癌部にわけ組織標本を採取した。またヒト前立腺癌細胞株（PC-3, DU145, LN-CaP）も使用した。

採取された組織ならびに細胞は凍結し、total RNA抽出に供した。凍結した検体はTRIzol試薬（Life Technologies, Inc. 製, Rockville, MD, USA）中でホモジナイズし、製造業者提供のプロトコールに従ってtotal RNAを単離した。混入された可能性のあるDNAはRNase-free DNaseI（和光純薬株式会社製）処理により除去した。total RNA（5 μ g）、オリゴdTプライマー及びAMV逆転写酵素（Life Technologies, Inc. 製）を用いて逆転写反応を行った。得られたcDNAの一部を用いて、PCRによりPCA-1遺伝子を增幅した。用いたPCR用反応混合液の組成は、25 μ l PCRバッファー中に、上記cDNA（20 ng）、KOD dash（TOYOB0社製）、dNTP（各0.2M）、10x KOD dash buffer（2.5 μ l）、プライマー1（配列番号4:0.2 μ M）、プライマー2（配列番号5:0.2 μ M）である。反応はDNAサーマルサイクラー（DNA Thermall Cycler 460, PerkinElmer Inc. 社製）を用いて、95°C 30秒間、60°C 30秒間、72°C 1分30秒間を35サイクル、最後に72°C 10分間の条件で行った。反応混合液をアガロースゲル電気泳動に供し、増幅産物を分離した。増幅産物を含むバンドを単離し、Concert（Life Technologies, Inc. 社製）により増幅産物を精製した。増幅産物をpT7-vector（Novagen社製）にサブクローニングし、PRISM 310 DNA sequencer（PerkinElmer社製）により塩基配列を決定した。

決定された塩基配列を配列番号 1 の塩基配列と比較し、また決定された塩基配列から予想されるアミノ酸配列と配列番号 2 の配列とを比較し、変異の有無を解析した。表 1 に結果を示す。

プライマー 1 (配列番号 4) : CTGAAAGCTCGGAGCAGAAGC (配列番号 1 における第 3

5 73 番目～第 393 番目の残基に対応)

プライマー 2 (配列番号 5) : GGTCTACTGTGGGAACAG (配列番号 1 における第 144

2 番目～第 1459 番目の残基に対応)

表 1

検 体 番 号	前 立 腺 癌	変異箇所	アミノ酸置換	変異の種類
1	+	G426T, C429T, G1132T	Arg7Leu, Ala8Val	ミスマッチ変異 サイレント変異
2	+	del(777-865), G1132T	-	欠失によるフレームシフト変異 サイレント変異
3	+	G494A, G623A, G815A, T836C, A1189T, G1132T	Ala30Thr, Asp73Asn, Ser144Pro, Gly137Arg, Lys261Asn	ミスマッチ変異 サイレント変異
4	+	A1187T, T568C, G1132T	Lys261*	ナンセンス変異 サイレント変異
5	+	C528T, C1090G	Thr41Ile, Asp228Glu	ミスマッチ変異
6	+	C1090G	Asp228Glu	ミスマッチ変異
7	+	C1090G, A1105T	Asp228Glu, Glu233Asp	ミスマッチ変異

10 表 1 中、「Ala30Thr」は「第 30 番目のアラニンのスレオニンへの変異」を意味する。「Lys261*」は「第 261 番目のリジンのストップコドンへの変異」を意味す

る。「T568C」は「第 568 番目のチミンのシトシンへの変異」を意味する。「del(777-865)」は「第 777 番目—第 865 番目の残基の欠失」を意味する。

また検体番号 1 ~ 4 は前立腺癌患者の癌部を、検体番号 5 は LN-CaP 細胞を、検体番号 6 は PC-3 細胞を、検体番号 7 は DU145 細胞をそれぞれ示す。

5 表 1 から明らかなように、全ての前立腺癌の検体において、PCA-1 遺伝子の変異が認められた（前立腺癌患者：4 / 4、前立腺癌細胞株：3 / 3）。変異の箇所、種類は多様であったが、G1132T の変異が全ての前立腺癌患者において確認され（4 / 4）、また Asp228Glu のアミノ酸置換を伴う C1090G の変異が全ての前立腺癌細胞株（3 / 3）において確認された。第 261 番目のリジンにおける変異も比較的高頻度に認められた（2 / 7）。複数の変異を有する検体がほとんどであった（前立腺癌患者：4 / 4、前立腺癌細胞株：2 / 3）。

10 また、PCA-1 の脱アルキル化酵素活性部位のアミノ酸変異をもたらす変異が、極めて高頻度に確認された（前立腺癌患者：3 / 4、前立腺癌細胞株：3 / 3）。このことは、PCA-1 遺伝子の変異による PCA-1 の脱アルキル化酵素活性の異常と前立腺癌の発症、進行等との関連を示唆する。

15 一方、非癌部においては上記 PCA-1 遺伝子の変異は認められなかった（3 人中 3 人）。

（実施例 2）

正常 PCA-1 (PCA-1WT) 遺伝子ならびに第 777 番目—第 865 番目の塩基 20 を欠失した PCA-1 (PCA-1Δ 777-865) 遺伝子を哺乳類発現ベクター (pEGFP) に組み込んだ。これらの発現ベクター（各 5 μ g）を DEAE-Dextran 法により COS-7 細胞 (1×10^6) にトランスフェクションした。コントロール群としては、空の発現ベクターを細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション 48 時間目に、0.25 mM メチルメタンスルホン酸 (MMS) を加え、核酸 25 のアルキル化傷害を誘発し、その 24 時間後に接着細胞数を測定した。結果を図 1 に示す。

図 1 から明らかなように、コントロール群ならびに PCA-1Δ 777-865 トランスフェクション群において、0.25 mM の MMS による核酸のアルキル化傷害にとも

なう約40%の細胞死が認められた。一方、PCA-1WT トランスフェクション群においては、MM S 誘発アルキル化傷害が顕著にレスキューされた。この結果から、正常PCA-1は *in vivo*において、アルキル化DNAの脱アルキル化活性を発現するが、PCA-1Δ777-865はその活性を欠失していることが示された。また、PCA-1の脱アルキル化酵素活性部位の変異は、脱アルキル化活性の異常をもたらし得ることが示された。

産業上の利用可能性

本発明の前立腺癌の判定方法を用いれば、簡易かつ高感度に前立腺癌を発症している危険がある又は発症する危険がある被検者を判定することができるので、前立腺癌の診断、経過観察、予後の予測、発症前診断、保因者診断等に有効である。

本出願は、日本で出願された特願2004-47036を基礎としており、それらの内容は本明細書に全て包含されるものである。

15

配列表フリーテキスト

配列番号4：PCA-1遺伝子を検出するためのPCRプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号5：PCA-1遺伝子を検出するためのPCRプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド

請求の範囲

1. 前立腺癌を発症している危険がある又は発症する危険がある被検者を判定するための方法であって、以下の工程：

5 a) 当該被検者由来の P C A – 1 遺伝子の変異の有無又は程度を解析する工程；及び

b) P C A – 1 遺伝子の変異の有無又は程度により、当該被検者が前立腺癌を発症している危険又は発症する危険の有無又は程度を判断する工程；
を含む、方法。

10 2. 変異がミスセンス変異、ナンセンス変異、サイレント変異及び欠失によるフレームシフト変異からなる群から選ばれる、請求項 1 に記載の方法。

3. ミスセンス変異が、P C A – 1 ポリペプチドの第 7 番目のアルギニンのロイシンへの変異、第 8 番目のアラニンのバリンへの変異、第 3 0 番目のアラニンのスレオニンへの変異、第 4 1 番目のスレオニンのイソロイシンへの変異、第 7 3 番目のアスパラギン酸のアスパラギンへの変異、第 1 3 7 番目のグリシンのアルギニンへの変異、第 1 4 4 番目のセリンのプロリンへの変異、第 2 2 8 番目のアスパラギン酸のグルタミン酸への変異、第 2 3 3 番目のグルタミン酸のアルパラギン酸への変異、及び第 2 6 1 番目のリジンのアスパラギンへの変異からなる群から選択されるアミノ酸の変異をもたらす変異である、請求項 2 に記載の方法。

15 4. ミスセンス変異が、P C A – 1 ポリペプチドの第 2 2 8 番目のアスパラギン酸のグルタミン酸への変異、第 2 3 3 番目のグルタミン酸のアルパラギン酸への変異、及び第 2 6 1 番目のリジンのアスパラギンへの変異からなる群から選択されるアミノ酸の変異をもたらす変異である、請求項 3 に記載の方法。

20 5. ミスセンス変異が P C A – 1 ポリペプチドの第 2 2 8 番目のアスパラギン酸のグルタミン酸への変異をもたらす変異である、請求項 4 に記載の方法。

6. ミスセンス変異が、P C A – 1 遺伝子の第 4 2 6 番目のグアニンのチミンへの変異、第 4 2 9 番目のシトシンのチミンへの変異、第 4 9 4 番目のグアニンのアデニンへの変異、第 5 2 8 番目のシトシンのチミンへの変異、第 6 2 3 番目のグアニ

ンのアデニンへの変異、第815番目のグアニンのアデニンへの変異、第836番目のチミンのシトシンへの変異、第1090番目のシトシンのグアニンへの変異、第1105番目のアデニンのチミンへの変異、及び第1189番目のアデニンのチミンへの変異からなる群から選択される変異である、請求項3に記載の方法。

5 7. ミスセンス変異が、PCA-1遺伝子の第1090番目のシトシンのグアニンへの変異、第1105番目のアデニンのチミンへの変異、及び第1189番目のアデニンのチミンへの変異からなる群から選択される変異である、請求項6に記載の方法。

8. ミスセンス変異が、PCA-1遺伝子の第1090番目のシトシンのグアニンへの変異、である、請求項7に記載の方法。

9. ナンセンス変異が、PCA-1ポリペプチドの第261番目のリジンのストップコドンへの変異をもたらす変異である、請求項2に記載の方法。

10. ナンセンス変異が、PCA-1遺伝子の第1187番目のアデニンのチミンへの変異である、請求項9に記載の方法。

15 11. サイレント変異が、PCA-1遺伝子の第568番目のチミンのシトシンへの変異、及び第1132番目のグアニンのチミンへの変異からなる群から選択される変異である、請求項2に記載の方法。

12. サイレント変異が、PCA-1遺伝子の第1132番目のグアニンのチミンへの変異である、請求項11に記載の方法。

20 13. 欠失が、PCA-1遺伝子の第777番目のアデニンから第865番目のシトシンまでの残基の欠失である、請求項2に記載の方法。

14. 以下の工程を含む、請求項1に記載の方法：

a) 当該被検者からポリヌクレオチドを単離又は精製する工程；

b) 当該ポリヌクレオチドからPCA-1遺伝子を增幅する工程；

25 c) 増幅されたPCA-1遺伝子の塩基配列を決定する工程；

d) 当該被検者由来のPCA-1遺伝子の変異の有無又は程度を解析する工程；

e) PCA-1遺伝子の変異の有無又は程度により、当該被検者が前立腺癌を発症している危険又は発症する危険の有無又は程度を判断する工程。

15. 配列番号1と比較して、第426番目のグアニンのチミンへの置換、第429番目のシトシンのチミンへの置換、第494番目のグアニンのアデニンへの置換、第528番目のシトシンのチミンへの置換、第623番目のグアニンのアデニンへの置換、第815番目のグアニンのアデニンへの置換、第836番目のチミンのシトシンへの置換、第1090番目のシトシンのグアニンへの置換、第1105番目のアデニンのチミンへの置換、第1189番目のアデニンのチミンへの置換、第1187番目のアデニンのチミンへの置換、第568番目のチミンのシトシンへの置換、第1132番目のグアニンのチミンへの置換、及び第777番目のアデニンから第865番目のシトシンまでの配列の欠失からなる群から選択される1以上の置換又は欠失を有する塩基配列を含むポリヌクレオチド。

16. 配列番号1と比較して、第426番目のグアニンのチミンへの置換、第429番目のシトシンのチミンへの置換、第494番目のグアニンのアデニンへの置換、第528番目のシトシンのチミンへの置換、第623番目のグアニンのアデニンへの置換、第815番目のグアニンのアデニンへの置換、第836番目のチミンのシトシンへの置換、第1090番目のシトシンのグアニンへの置換、第1105番目のアデニンのチミンへの置換、第1189番目のアデニンのチミンへの置換、第1187番目のアデニンのチミンへの置換、及び第777番目のアデニンから第865番目のシトシンまでの配列の欠失からなる群から選択される1以上の置換又は欠失を有する塩基配列にコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチド。

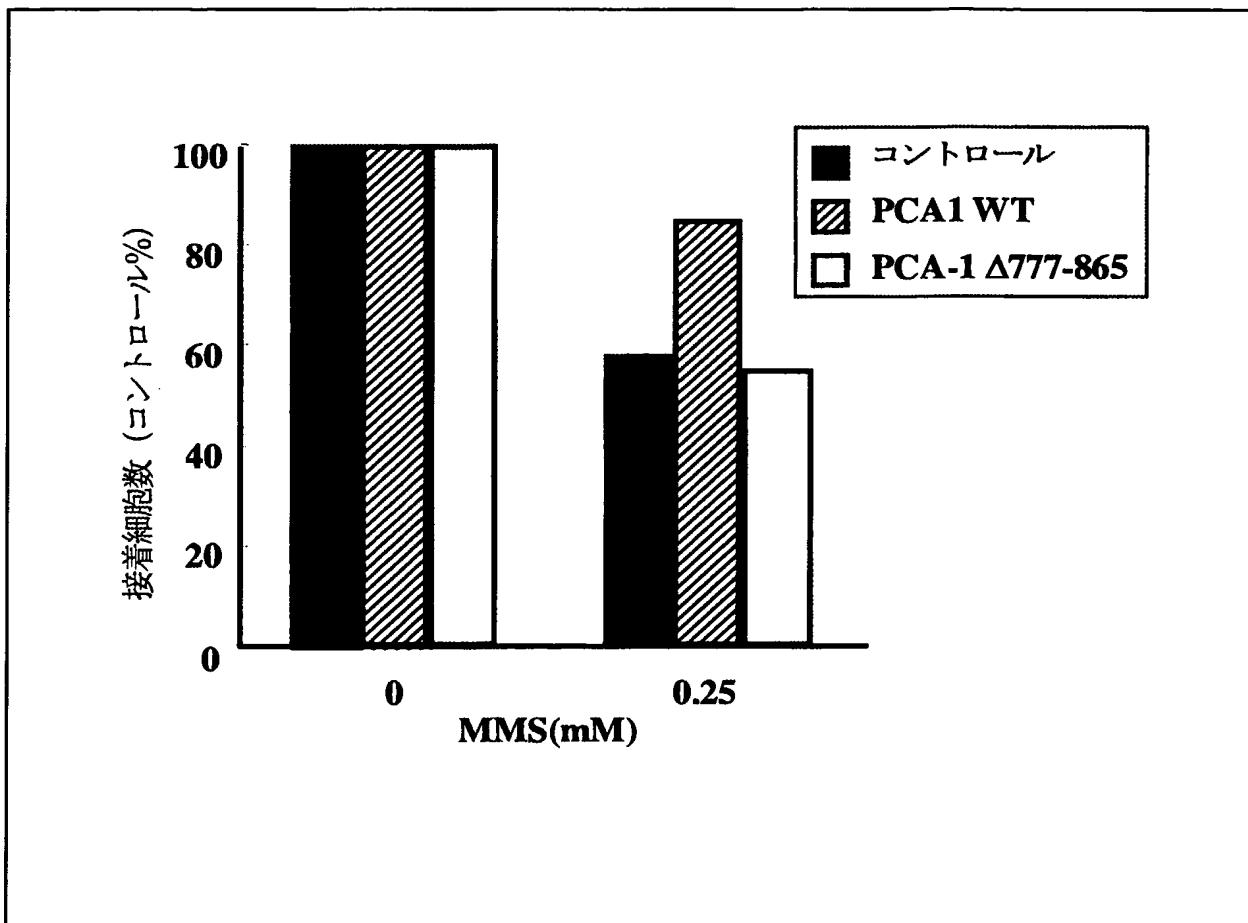
17. 請求項16のポリペプチドを免疫特異的に認識する抗体。

18. 前立腺癌を発症している危険がある又は発症する危険がある被検者を判定するためのキットであって、PCA-1遺伝子変異解析用試薬を含む、キット。

19. PCA-1遺伝子変異解析用試薬が、前立腺癌を発症している危険がある又は発症する危険がある被検者を判定するために使用できる、又は使用すべきであることを記載した記載物を更に含む、請求項18に記載のキット。

1/1

図 1



配列表

SEQUENCE LISTING

<110> Yamamoto, Hiroshi

Konishi, Noboru

<120> A method for decision of prostate tumor

<130> 09680

<150> JP 2004-47036

<151> 2004-02-23

<160> 5

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 1520

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (407)..(1267)

2/10

<400> 1

aggtcacaga ctgcggagtg ggtcagggc tgcgaggcgt gccccaaagtc ctaccgggtt 60
tgcacggcg cgccccggctc cgccccgcaag tgccgccttcc tgacttactg ctgggtgcgc 120
ggggctgggg gtgcgagtag caccctgaa gtctttctt gggcgacctc cggggccctca 180
ttcttaggcct ccttaaagag aaggatctaa attaggaaaa ggaagtgcgg ttatccacga 240
ccaagctctt ccacctgcgg agctcgctta gtctgcacct caaccgtgcg gaaagtgact 300
gccctgttta ctgaggaaaa actggggctc agaaagatac catggagtag tttgaaacag 360
gaacaaaatc ttctgaaagc tcggagcaga agccttttg gtcaac atg gag gaa 415
Met Glu Glu
1
aaa aga cgg cga gcc cga gtt cag gga gcc tgg gct gcc cct gtt aaa 463
Lys Arg Arg Arg Ala Arg Val Gln Gly Ala Trp Ala Ala Pro Val Lys
5 10 15
agc cag gcc att gct cag cca gct acc act gct aag agc cat ctc cac 511
Ser Gln Ala Ile Ala Gln Pro Ala Thr Thr Ala Lys Ser His Leu His
20 25 30 35
cag aag cct ggc cag acc tgg aag aac aaa gag cat cat ctc tct gac 559
Gln Lys Pro Gly Gln Thr Trp Lys Asn Lys Glu His His Leu Ser Asp
40 45 50

aga gag ttt gtg ttc aaa gaa cct cag cag gta gta cgt aga gct cct 607
Arg Glu Phe Val Phe Lys Glu Pro Gln Gln Val Val Arg Arg Ala Pro
55 60 65

gag cca cga gtg att gac aga gag ggt gtg tat gaa atc agc ctg tca 655
Glu Pro Arg Val Ile Asp Arg Glu Gly Val Tyr Glu Ile Ser Leu Ser
70 75 80

ccc aca ggt gta tct agg gtc tgt ttg tat cct ggc ttt gtt gac gtg 703
Pro Thr Gly Val Ser Arg Val Cys Leu Tyr Pro Gly Phe Val Asp Val
85 90 95

aaa gaa gct gac tgg ata ttg gaa cag ctt tgt caa gat gtt ccc tgg 751
Lys Glu Ala Asp Trp Ile Leu Glu Gln Leu Cys Gln Asp Val Pro Trp
100 105 110 115

aaa cag agg acc ggc atc aga gag gat ata act tat cag caa cca aga 799
Lys Gln Arg Thr Gly Ile Arg Glu Asp Ile Thr Tyr Gln Gln Pro Arg
120 125 130

ctt aca gca tgg tat gga gaa ctt cct tac act tat tca aga atc act 847
Leu Thr Ala Trp Tyr Gly Glu Leu Pro Tyr Thr Tyr Ser Arg Ile Thr
135 140 145

atg gaa cca aat cct cac tgg cac cct gtg ctg cgc aca cta aag aac 895
Met Glu Pro Asn Pro His Trp His Pro Val Leu Arg Thr Leu Lys Asn
150 155 160

cgc att gaa gag aac act ggc cac acc ttc aac tcc tta ctc tgc aat 943
Arg Ile Glu Glu Asn Thr Gly His Thr Phe Asn Ser Leu Leu Cys Asn
165 170 175

ctt tat cgc aat gag aag gac agc gtg gac tgg cac agt gat gat gaa 991
Leu Tyr Arg Asn Glu Lys Asp Ser Val Asp Trp His Ser Asp Asp Glu
180 185 190 195

ccc tca cta ggg agg tgc ccc att att gct tca cta agt ttt ggt gcc 1039
Pro Ser Leu Gly Arg Cys Pro Ile Ile Ala Ser Leu Ser Phe Gly Ala
200 205 210

aca cgc aca ttt gag atg aga aag aag cca cca gaa gag aat gga 1087
Thr Arg Thr Phe Glu Met Arg Lys Lys Pro Pro Pro Glu Glu Asn Gly
215 220 225

gac tac aca tat gtg gaa aga gtg aag ata ccc ttg gat cat ggg acc 1135
Asp Tyr Thr Tyr Val Glu Arg Val Lys Ile Pro Leu Asp His Gly Thr
230 235 240

ttg tta atc atg gaa gga gcg aca caa gct gac tgg cag cat cga gtg 1183
Leu Leu Ile Met Glu Gly Ala Thr Gln Ala Asp Trp Gln His Arg Val
245 250 255

ccc aaa gaa tac cac tct aga gaa ccg aga gtg aac ctg acc ttt cgg 1231
Pro Lys Glu Tyr His Ser Arg Glu Pro Arg Val Asn Leu Thr Phe Arg
260 265 270 275

5/10

aca gtc tat cca gac cct cga ggg gca ccc tgg tga cgtcagagct 1277

Thr Val Tyr Pro Asp Pro Arg Gly Ala Pro Trp

280

285

ttgagagaga agcttcactg aaacggagca aaccttccac tgagaagcca cttcaagagg 1337

ctgggtgctgc tagatctcat gatgtggctg ttgggaagat ggtggggttt gtttgcac 1397

ttggagtcct attaaatgaa agccagcaac tcatgttgtt aataggtcta ctgtggaaac 1457

agttatccct aaccacagct caaaatcgct atcatctta ggcaaattaa aatctatgtg 1517

gca 1520

<210> 2

<211> 286

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Glu Glu Lys Arg Arg Arg Ala Arg Val Gln Gly Ala Trp Ala Ala

1

5

10

15

Pro Val Lys Ser Gln Ala Ile Ala Gln Pro Ala Thr Thr Ala Lys Ser

6/10

20

25

30

His Leu His Gln Lys Pro Gly Gln Thr Trp Lys Asn Lys Glu His His

35

40

45

Leu Ser Asp Arg Glu Phe Val Phe Lys Glu Pro Gln Gln Val Val Arg

50

55

60

Arg Ala Pro Glu Pro Arg Val Ile Asp Arg Glu Gly Val Tyr Glu Ile

65

70

75

80

Ser Leu Ser Pro Thr Gly Val Ser Arg Val Cys Leu Tyr Pro Gly Phe

85

90

95

Val Asp Val Lys Glu Ala Asp Trp Ile Leu Glu Gln Leu Cys Gln Asp

100

105

110

Val Pro Trp Lys Gln Arg Thr Gly Ile Arg Glu Asp Ile Thr Tyr Gln

115

120

125

Gln Pro Arg Leu Thr Ala Trp Tyr Gly Glu Leu Pro Tyr Thr Tyr Ser

7/10

130

135

140

Arg Ile Thr Met Glu Pro Asn Pro His Trp His Pro Val Leu Arg Thr

145

150

155

160

Leu Lys Asn Arg Ile Glu Glu Asn Thr Gly His Thr Phe Asn Ser Leu

165

170

175

Leu Cys Asn Leu Tyr Arg Asn Glu Lys Asp Ser Val Asp Trp His Ser

180

185

190

Asp Asp Glu Pro Ser Leu Gly Arg Cys Pro Ile Ile Ala Ser Leu Ser

195

200

205

Phe Gly Ala Thr Arg Thr Phe Glu Met Arg Lys Lys Pro Pro Pro Glu

210

215

220

Glu Asn Gly Asp Tyr Thr Tyr Val Glu Arg Val Lys Ile Pro Leu Asp

225

230

235

240

His Gly Thr Leu Leu Ile Met Glu Gly Ala Thr Gln Ala Asp Trp Gln

8/10

245

250

255

His Arg Val Pro Lys Glu Tyr His Ser Arg Glu Pro Arg Val Asn Leu
260 265 270

Thr Phe Arg Thr Val Tyr Pro Asp Pro Arg Gly Ala Pro Trp
275 280 285

<210> 3

<211> 861

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

atggaggaaa aaagacggcg agcccgagtt cagggagcct gggctgcccc tggtaaaagc 60

caggccattg ctcagccagc taccactgct aagagccatc tccaccagaa gcctggccag 120

acctggaaga acaaagagca tcatactctt gacagagagt ttgtgttcaa agaacctcag 180

caggtagtagtac gtagagctcc tgagccacga gtgattgaca gagagggtgt gtatgaaatc 240

agcctgtcac ccacaggtgt atctagggtc tggttgatc ctggctttgt tgacgtgaaa 300

gaagctgact ggatattgga acagcttgtt caagatgttc cctggaaaca gaggaccggc 360

9/10

atcagagagg atataactta tcagcaacca agacttacag catgttatgg agaacttcct 420
tacacttatt caagaatcac tatggaacca aatcctcact ggcaccctgt gctgcgcaca 480
ctaaagaacc gcattgaaga gaacactggc cacaccttca actccttact ctgcaatctt 540
tatcgcaatg agaaggacag cgtggactgg cacagtgtatg atgaaccctc actagggagg 600
tgccccatta ttgcttcaact aagtttggt gccacacgca catttgagat gagaaagaag 660
ccaccaccag aagagaatgg agactacaca tatgtggaaa gagtgaagat acccttggat 720
catgggaccc tttaatcat ggaaggagcg acacaagctg actggcagca tcgagtgc 780
aaagaatacc actctagaga accgagatgt aacctgaccc ttccggacagt ctatccagac 840
cctcgagggg caccctggtg a 861

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer for detection of
PCA-1 gene

10/10

<400> 4

ctgaaaagctc ggagcagaag c

21

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer for detection of
PCA-1 gene

<400> 5

ggtctactgt ggaaacag

18

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用)

VIII-5-1	不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て(規則4.17(v)及び51の2.1(a)(v)) 氏名(姓名)	本国際出願 に関し、 山元 弘 は、本国際出願の請求項に記載された対象が以下のように開示されたことを申し立てる。
VIII-5-1(i)	開示の種類: i)	刊行物
VIII-5-1(ii)	開示の日付:	2003年 08月 25日 (25. 08. 2003)
VIII-5-1(iii)	開示の名称:	DNA, RNA脱メチル化酵素PCA-1(hABH3)のクローニング と発現解析
VIII-5-1(iv)	開示の場所:	第62回総会(名古屋) 日本癌学会総会記事 第38 7-388頁
VIII-5-1(i)	開示の種類: i)	その他 口頭発表
VIII-5-1(ii)	開示の日付:	2003年 09月 26日 (26. 09. 2003)
VIII-5-1(iii)	開示の名称:	DNA, RNA脱メチル化酵素PCA-1(hABH3)のクローニング と発現解析
VIII-5-1(iv)	開示の場所:	名古屋国際会議場(名古屋市) 第62回日本癌学会 学術総会
VIII-5-1(i)	開示の種類: i)	刊行物
VIII-5-1(ii)	開示の日付:	2003年 11月 25日 (25. 11. 2003)
VIII-5-1(iii)	開示の名称:	DNA, RNAアルキル化損傷修復酵素PCA-1(hABH3)の発現 と機能解析
VIII-5-1(iv)	開示の場所:	第26回日本分子生物学会年会 プログラム・講演要 旨集 第525頁
VIII-5-1(i)	開示の種類: i)	その他 口頭発表
VIII-5-1(ii)	開示の日付:	2003年 12月 13日 (13. 12. 2003)
VIII-5-1(iii)	開示の名称:	DNA, RNAアルキル化損傷修復酵素PCA-1(hABH3)の発現 と機能解析
VIII-5-1(iv)	開示の場所:	神戸ポートアイランド(神戸市) 第26回日本分子 生物学会年会
VIII-5-1(v)	本申立ては、次の指定国のためになされた ものである。:	すべての指定国

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/012446

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/00, C07K14/47, C07K16/18, C12Q1/68, G01N33/53, G01N33/574

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/00, C07K14/47, C07K16/18, C12Q1/68, G01N33/53, G01N33/574

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/Geneseq,
CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TSUJIKAWA, K. et al., "Expression and functional analysis of PCA-1 (hABH3), a new DNA and RNA alkylation damage repair enzyme", Program and Abstracts, The 26th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, December 10-13, 2003 Kobe, Japan (publication date 25 November, 2003 (25.11.03)), page 525, Abst. No.04I-2 (oral disclosure on 13 December, 2003 (13.12.03))	1-19

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
30 September, 2004 (30.09.04)Date of mailing of the international search report
19 October, 2004 (19.10.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/012446

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TSUJIKAWA, K. et al., "Molecular cloning and expression analysis of DNA and RNA demethylase PCA-1 (hABH3)", Proceedings Sixty-Second Annual Meeting of the Japanese Cancer Association September 25-27, 2003, Nagoya (publication date 25 August, 2003 (25.08.03)), pages 387 to 388, Abst.No.2373-PA (oral disclosure on 26 September, 2003 (26.09.03))	1-19
Y	Duncan, T. et al., "Reversal of DNA alkylation damage by two human dioxygenases", Proc.Natl. Acad.Sci.USA., (2002), Vol.99, No.26, pages 16660 to 16665	1-19
Y	Aas Per Arne et al., "Human and bacterial oxidative demethylases repair alkylation damage in both RNA and DNA", Nature, 20 February, 2003 (20.02.03), Vol.421, No.6925, pages 859 to 863	1-19
Y	WO 02/055700 A2 (Chiron Corp.), 18 July, 2002 (18.07.02), SEQ ID NOS 720, 721, 937, 941; table 2; Claims & CA 2430794 A & WO 03/050236 A2 & US 2003/0215803 A1 & EP 1379651 A	1-19

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2004/012446

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N15/00, C07K14/47, C07K16/18, C12Q1/68, G01N33/53, G01N33/574

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N15/00, C07K14/47, C07K16/18, C12Q1/68, G01N33/53, G01N33/574

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

Genbank/EMBL/DDBJ/GenSeq

SwissProt/PIR/GenSeq

CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Tsujikawa, K., et al., "Expression and functional analysis of PCA-1 (hABH3), a new DNA and RNA alkylation damage repair enzyme" Program and Abstracts, The 26th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, December 10-13, 2003 Kobe, Japan (publication date 2003 Nov 25), p. 525, Abst. no. 04I-2 (oral disclosure on 2003 Dec 13)	1-19

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

30.09.2004

国際調査報告の発送日

19.10.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

新留 豊

4B

9639

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
X	Tsujikawa, K., et al., "Molecular cloning and expression analysis of DNA and RNA demethylase PCA-1 (hABH3)" Proceedings Sixty-Second Annual Meeting of the Japanese Cancer Association September 25-27, 2003, Nagoya (publication date 2003 Aug 25), pp. 387-388, Abst no. 2373-PA (oral disclosure on 2003 Sep 26)	1-19
Y	Duncan, T., et al., "Reversal of DNA alkylation damage by two human dioxygenases" Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (2002), Vol. 99, No. 26, pp. 16660-16665	1-19
Y	Aas Per Arne, et al., "Human and bacterial oxidative demethylases repair alkylation damage in both RNA and DNA" Nature, (2003 Feb 20), Vol. 421, No. 6925, pp. 859-863	1-19
Y	WO 02/055700 A2 (Chiron Corp.), 2002.07.18, SEQ ID NOS 720, 721, 937, 941, Table 2 及び請求の範囲参照 & CA 2430794 A & WO 03/050236 A2 & US 2003/0215803 A1 & EP 1379651 A	1-19